

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. E. Scharrer)

Untersuchungen zur Regulation der Chloridhomöostase bei alimentärem Chlorid-Mangel

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von

REGULA WUERMLI

Tierärztin
von Adliswil (Kt. Zürich)

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. E. Scharrer, Referent
Prof. Dr. M. Wanner, Korreferent

Zürich 1986

Maus-Offsetdruck, Konstanz 1986

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. E. Scharrer)

UNTERSUCHUNGEN ZUR REGULATION DER CHLORIDHOMOEOSTASE BEI
ALIMENTAEREM CHLORID-MANGEL

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von

REGULA WUERMLI

Tierärztin
von Adliswil (Kt. Zürich)

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. E. Scharrer, Referent
Prof. Dr. M. Wanner, Korreferent

Zürich 1986

Maus-Offsetdruck, Konstanz 1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507228_0008

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR	2
2.1. Mechanismen des intestinalen Na^+ -, Cl^- - und HCO_3^- -Transportes	2
2.2.1. Dünndarm	2
2.2.2. Colon	3
2.2. Mechanismen des Elektrolyttransportes in der Niere	5
3. MATERIAL UND METHODEN	8
3.1. Tiermaterial und Fütterung	8
3.2. Versuchstechnik	11
3.3. Bestimmung der Resorption der Elektrolyte	13
3.3.1. Aufarbeitung der Proben	13
3.3.2. Messung der Elektrolytkonzentrationen	13
3.3.3. Berrechnung der Resorption (Sekretion) der Elektrolyte	13
3.3.4. Berrechnung der Wasserresorption	15
3.4. Untersuchung der Harn- und Blutproben	15
3.4.1. Probengewinnung und Aufbereitung	15
3.4.2. Blutgasanalyse	16
3.5. Statistik	16
4. ERGEBNISSE	17
4.1. Einfluss von Nitrat auf die Elektrolyt- und Wasserresorption	17
4.1.1. Dünndarm	17
4.1.2. Colon	18

4.2.	Wachstum und Futteraufnahme der Tiere bei Fütterung mit einer Cl^- -armen Diät	23
4.3.	Blutwerte	26
4.4.	Harnwerte	30
4.5.	Einfluss einer Cl^- -armen Diät auf die Elektrolyt- und Wasserresorption	33
5.	DISKUSSION	41
6.	ZUSAMMENFASSUNG	45
7.	LITERATURVERZEICHNIS	49

1. EINLEITUNG

Untersuchungen zur Regulation des Chloridhaushaltes sind sehr spärlich, obgleich Cl^- das mengenmässig bedeutenste Anion der extrazellulären Flüssigkeit repräsentiert und eine Chloriddepletion bei chronischem Erbrechen oder auch bei der Labmagenverlagerung des Rindes vorkommt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, wie sich eine alimentäre Chloridunterversorgung auf die intestinale Resorption von Cl^- und anderen Elektrolyten, sowie auf die Elektrolytzusammensetzung des Plasmas und des Harns auswirkt.

In Vorversuchen wurde zur näheren Charakterisierung der in verschiedenen Darmabschnitten vorhandenen Cl^- -Resorptionsmechanismen geprüft, inwieweit die Cl^- -Resorption durch NO_3^- , einem Inhibitor des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschmechanismus, gehemmt wird.

2. LITERATUR

2.1. Mechanismen des intestinalen Na^+ , Cl^- und HCO_3^- -Transportes

2.1.1. Dünndarm

Im Dünndarm unterscheidet man zwischen undifferenzierten Kryptenzellen und Villuszellen. Lediglich die Villuszellen vermögen Elektrolyte zu resorbieren (Madara und Marcial, 1984). Das Absorbat im Dünndarm ist, ähnlich wie im proximalen Nierentubulus, isoton.

Im Jejunum findet eine Nettoresorption von Na^+ , Cl^- und HCO_3^- statt. Der grösste Teil der Na^+ -Resorption erfolgt über den mit Na^+ gekoppelten Transport von organischen Substraten (Gunther et al., 1983). Durch den Na^+ -Glukose-Cotransport wird das transepitheliale elektrische Potential erhöht (Blutseite positiv), was wiederum die passive Cl^- -Resorption entlang dem elektrischen Potential fördert (Podesta und Mettrich, 1977). Ein Na^+/H^+ -Austauschmechanismus, der die Resorption von HCO_3^- stimuliert, konnte im Jejunum des Kaninchens nachgewiesen werden (Turnberg, 1978, Charney und Feldman, 1984, Gunther et al., 1983). Das HCO_3^- fängt die sezernierten Protonen ab und das daraus entstandene H_2CO_3 dissoziiert in H_2O und CO_2 , welches von der Zelle aufgenommen wird. Neben dem Na^+/H^+ -Austauschmechanismus existieren vermutlich noch spezifische Na^+ - und H^+ -Kanäle in der luminalen Zellmembran (Gunther et al., 1983). Ein Na^+/Cl^- -Cotransport scheint im Jejunum nicht zu existieren. In Untersuchungen an isolierten intestinalen Bürstensaummembranvesikeln wurde ein vom pH-Wert abhängiger Cl^- -Transport beschrieben (Gunther et al., 1983).

Im Ileum findet eine Nettoresorption von Na^+ und Cl^- , sowie eine Nettosekretion von HCO_3^- statt. Dabei konnte ein elektrogener Na^+ -Transport durch spezifische Na^+ -Kanäle in der Bürstensaummembran sowie ein gekoppelter, elektroneutraler Na^+/Cl^- -Cotransport, welcher aus einem Na^+/H^+ - und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschmechanismus besteht, nachgewiesen werden (Frizzell und Schultz, 1979, Tai und Decker, 1980, Knickelbein et al., 1983 und 1985, Murer und Burckhardt, 1983).

Im Jejunum wird somit in Abwesenheit von Zuckern und Aminosäuren über den Na^+/H^+ -Austauschmechanismus vor allem Na^+ und HCO_3^- resorbiert, während im Ileum vorwiegend Na^+ und Cl^- über einen doppelten Ionenaustauschmechanismus resorbiert wird (Gunther und Wright, 1983).

Die Kryptenzellen des Dünndarmes sind zu einer aktiven elektrogenen Cl^- -Sekretion fähig (Frizzell und Schultz, 1979). Diese wird durch neurohumorale und luminale Stimuli verursacht, welche über eine Erhöhung des intrazellulären cAMP- oder Ca^{++} -Gehaltes wirken. Das Cl^- gelangt gekoppelt mit Na^+ entlang einem elektrochemischen Gradienten über die basolateralen Membranschnitte in die Epithelzelle und wird über spezifische Cl^- -Kanäle in der Bürstensaummembran ins Darmlumen sezerniert. Die Na^+ -Ionen werden mittels der Na^+/K^+ -Pumpe wieder durch die basolaterale Membran ausgeschleust. Natrium folgt als Gegenion dem sezernierten Cl^- parazellulär durch die Zonulae occludentes.

2.1.1. Colon

Das Colon der Säuger ist zusammen mit der Niere wesentlich an der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes beteiligt. Dabei findet bei der Ratte im Colon eine Netto-Resorption von

H_2O , Na^+ und Cl^- sowie eine Nettosekretion von HCO_3^- statt (Binder und Rawlins, 1973, Frizzell et al., 1976, Vernay et al., 1984, Smith und McCabe, 1984). Morphologisch gesehen kann man im Colon zwei Zelltypen unterscheiden: Die Oberflächenzellen sind für die Resorption zuständig, während die Sekretion durch die Kryptenzellen stattfindet (Welsh et al., 1982). Der parazelluläre Weg, welcher einen Elektrolyt- und Wasserfluss in beide Richtungen erlaubt, nimmt im Colon nach caudal immer mehr an Bedeutung ab. So beträgt die Na^+ -Permeabilität des Colon descendens nur noch die Hälfte der Na^+ -Permeabilität des Colon ascendens und Ileums (Yau und Makhlouf, 1975, Turnberg, 1978). Das transepitheliale elektrische Potential nimmt dagegen caudalwärts immer mehr zu. Im Colon descendens und Rectum ist dank der relativ dichten Verbindung der Zellen (tight junction) auch ein transepithelialer Elektrolyttransport gegen einen Konzentrationsgradienten möglich.

Bezüglich der Mechanismen des aktiven Transports im Colon bestehen neben tierartlichen Unterschieden auch wesentliche Unterschiede zwischen Colon ascendens und Colon descendens.

Bei der Ratte sind folgende aktive Transportmechanismen für Na^+ , Cl^- und HCO_3^- bekannt: Im Colon ascendens überwiegt ein elektroneutraler Na^+/Cl^- -Cotransport (Binder und Rawlins, 1973, Stoebel und Goldner, 1975), wobei der Na^+ -Transport entlang dem elektrochemischen Gradienten die Energie für den entgegen den elektrochemischen Gradienten gerichteten Cl^- -Transport liefert. Der in die Zelle gerichtete Na^+ -Gradient wird durch die in der basolateralen Membran gelegene Na^+/K^+ -Pumpe aufrechterhalten. Im Colon descendens überwiegt ein elektrogener Na^+ -Transport. Dabei gelangt das Na^+ durch spezifische Na^+ -Kanäle in der luminalen Zellmembran in die Zelle. Dieser Transportvorgang ist mit Amilorid hemmbar und steht unter Aldosteronkontrolle (Sandle et al., 1984). Basolateral wird Na^+ über die Na^+/K^+ -Pumpe aus der

Zelle geschleust. Die Resorption von Cl^- erfolgt einerseits über einen gekoppelten Na^+/Cl^- -Cotransport (s. Colon ascenden). Daneben wird ein Na^+ unabhängiger $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschmechanismus angenommen, bei dem die Sekretion von HCO_3^- die Cl^- -Resorption energetisiert (Frizzell et al., 1976).

Auch im Colon ist eine elektrogene Cl^- -Sekretion durch die Kryptenzellen analog wie im Dünndarm möglich (Welsh et al., 1982, Frizzell et al., 1983).

2.2. Mechanismen des Elektrolyttransportes in der Niere

Die Nieren spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes des Körpers. Sie kontrollieren die Osmolarität, das Volumen der extrazellulären Flüssigkeit, den Säure-Basen-Status und die ionische Zusammensetzung der extrazellulären Flüssigkeit.

Im proximalen Tubulus werden 60-70% des Filtrates isosmotisch rückresorbiert, wobei eine Nettoresorption von Na^+ , K^+ , Cl^- und HCO_3^- stattfindet. In den ersten Abschnitten der pars convoluta wird Na^+ gekoppelt mit organischen Substanzen (z.B. Glukose, Aminosäuren etc.) aktiv resorbiert, wobei der in die Zelle gerichtete Na^+ -Gradient die Energie für den Zucker- und Aminosäuretransport liefert. Daneben sorgt ein Na^+/H^+ -Austauschmechanismus für die Resorption von Na^+ (Murer et al., 1976, Kinsella und Aronson, 1980, Harlan und Warnock, 1983, Cassano et al., 1984, 1983, Mircheff et al., 1984. Nord et al, 1984). Bicarbonat als wichtigste Puffersubstanz in diesem Abschnitt des Nephrons fängt H^+ ab. Aus dem entstehenden H_2CO_3 wird in der Bürstensaummembran durch das Enzym Carboanhydrase H_2O und CO_2 gebildet, woraus nach Aufnahme in die Zelle erneut H^+ und HCO_3^- entstehen. Die Protonen werden wieder im Austausch mit Na^+ se-

niert und das HCO_3^- gelangt in die Blutbahn. Da in den ersten Abschnitten des proximalen Tubulus vorwiegend Na^+ und HCO_3^- resorbiert werden (Seifter et al., 1984, Alpern et al., 1985), steigt die Cl^- -Konzentration in den distal gelegenen Abschnitten des proximalen Tubulus, was für die Cl^- -Resorption von Bedeutung ist. Die passive Komponente der Cl^- -Resorption erfolgt parazellulär entlang dem elektrochemischen Gradienten. Alpern et al. (1985) konnten zeigen, dass neben der passiven Cl^- -Resorption noch ein aktiver Cl^- -Resorptionsmechanismus besteht, der elektroneutral und durch Cyanid hemmbar ist. Das genaue Funktionsprinzip dieses Mechanismus ist noch nicht bekannt.

Bedingt durch die aktive Na^+/Cl^- -Resorption wird im aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife die Tubulusflüssigkeit hypoton, da das Tubulusepithel in diesem Nephronabschnitt wasserundurchlässig ist. In der luminalen Zellmembran der Epithelzellen im aufsteigenden Schenkel der Henleschen Schleife existiert ein $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ -Cotransport (Greger, 1985). Da ein Teil des K^+ über K^+ -Kanäle in der luminalen Membran wieder in das Tubuluslumen gelangt, findet ein Nettotransport von negativen Ladungen statt, was zur Folge hat, dass das Tubuluslumen des aufsteigenden Astes der Henleschen Schleife, im Gegensatz zu den übrigen Abschnitten des Nephrons, ein positives Potential gegenüber der Blutseite aufweist. Auf der basolateralen Zellseite wird Na^+ über die Na^+/K^+ -Pumpe wieder aus der Zelle befördert. Für Cl^- existieren in den basolateralen Membranabschnitten spezifische Kanäle, sowie zusätzlich ein K^+/Cl^- -Cotransport, der Cl^- und K^+ aus der Zelle schleust.

Im distalen Tubulus findet eine aktive Resorption bzw. Sekretion der Elektrolyte, entsprechend den Bedürfnissen des Organismus statt. Dieser Tubulusabschnitt steht unter der Kontrolle von Hormonen. Aldosteron fördert die Na^+ -Resorption im distalen Tubulus und Sammelrohr, die z.T. im Austausch gegen K^+ oder H^+

erfolgt. Die Na^+ -Resorption bzw. die K^+ -Sekretion verlaufen über voneinander unabhängige Kanäle in der luminalen Zellmembran (Lote, 1983).

Im Sammelrohr wird die endgültige Osmolarität des Urins festgelegt. Die Wasserrückresorption in diesem Segment ist von ADH abhängig. Die Na^+ -Rückresorption ist eng gekoppelt mit der H^+ -Sekretion, welche gegen einen Konzentrationsgradienten erfolgt. Die sezernierten H^+ -Ionen werden vor allem durch HPO_4^{--} und NH_3 gepuffert. Bicarbonat kann je nach Bedürfniss resorbiert bzw. sezerniert werden. Möglicherweise ist auch hier ein $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -, Austauschmechanismus vorhanden (McKinney und Burg, 1977, Garcia-Austt et al., 1985).

3. Material und Methoden

3.1. Tiermaterial und Fütterung

Sämtliche Versuche wurden mit männlichen SIVZ-50-Ratten (Institut für Zuchthygiene, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Zürich) durchgeführt.

Die Tiere erhielten zunächst eine kommerzielle Rattendiät und wurden dann 2-3 Wochen vor Versuchsbeginn auf eine Cl^- -arme Diät bzw. Kontrolldiät umgestellt (Diätzusammensetzung s. Tabelle 1). Der Mineralsalzanteil der Diäten unterschied sich nur im Cl^- -Gehalt (Tabelle 2). Die Tiere wurden in Einzelkäfigen gehalten. Wasser (aqua dest.) und Futter stand ad libitum zur Verfügung. Die Versuche wurden sowohl mit adulten als auch mit juvenilen Ratten durchgeführt. Bei Versuchsbeginn betrug das durchschnittliche Körpergewicht 150-250g (adulte Ratten, mehrere Versuche) bzw. 60g (wachsende Ratten, 2 Versuche).

Zur Bestimmung des Cl^- -Gehaltes in den Diäten sowie den einzelnen Komponenten wurde je 1g der jeweiligen Mischung bzw. Komponente in 10ml dest. H_2O aufgeschwemmt. Die Cl^- -Konzentration im Ueberstand wurde nach 15 minütiger Zentrifugation (3000 U/min) mit Hilfe eines Chloridometers (Clotronic elvi 535, Milano, Italien) bestimmt. Die Analysen ergaben folgende Cl^- -Konzentrationen (g/kg): Kontrolldiät 4,55, Cl^- -Mangeldiät 0,47 (von den 0,47% Cl^- gelangten 0,27% über das Kasein und 0,20% über die Vitaminmischung in die Cl^- -Mangeldiät).

Bei einigen Versuchen wurde die tägliche Gewichtszunahme, sowie der tägliche Futter- und Wasserkonsum der Ratten, die die Kontroll- bzw. Cl^- -arme Diät erhielten, gemessen.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Diäten

	<u>Cl⁻-arme Diät</u>	<u>Kontrolldiät</u>
Saccharose ¹	76,53%	76,80%
Kasein ²	12,87%	12,87%
Sojaöl	3,33%	3,33%
Vitaminmischung ³	3,00%	3,00%
Mineralsalzmischung ⁴	3,32%	3,32%
NaCl	—	0,68%
Na-Acetat	0,95%	—
	100,00%	100,00%

¹Grieszucker 00 ,Zuckermühle Rapperswil AG

²Säurekasein, UFAG Sursee, mit 1% DL-Methionin ergänzt.

³Vitaminprämix 2499, Kliba, AG Basel,

Zusammensetzung pro kg Diät: 14000 IE D₃, 98 mg E, 36 mg C, 20 mg B₁, 12 mg B₂, 9 mg B₆, 24 µg B₁₂, 36 mg Nikotinsäure, 30 mg Panthotensäure, 2 mg Folsäure, 60 µg Biotin, 375 mg Cholinchlorid.

⁴Spezialprämix 2269, NaCl-frei, Kliba AG, Basel

(Zusammensetzung s. Tabelle 2)

Tabelle 2: Zusammensetzung der Mineralstoffmischung

Angaben in g pro 33,2g Mineralstoffmischung, 1kg Diät enthält 33,2g dieser Mineralstoffmischung, zusätzlich noch 6,80g/kg Diät NaCl bei der Kontrolldiät und 9,54g/kg Diät Na-Acetat bei der Cl⁻-armen Diät.

	<u>Kontrolldiät</u>	<u>Cl⁻-arme Diät</u>
Ca	6,49	6,49
P	3,32	3,32
K	3,64	3,64
Mg	1,56	1,56
Mn	0,027	0,027
Fe	0,117	0,117
Cu	0,007	0,007
Zn	0,016	0,016
J	0,001	0,001
F	0,003	0,003
Na	2,65	2,65
Cl	4,08	—

Die Versuche, in denen zur Identifizierung eines $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschmechanismus (Aronson und Seifter, 1984) der Einfluss von Nitrat auf die Elektrolytaborption in verschiedenen Darmabschnitten untersucht wurde, wurden mit Ratten, die eine Standard-Diät (Mäuse- und Rattenerhaltungsfutter Nr. 890, NAFAG, Gossau SG, Schweiz) erhielten, durchgeführt.

3.2. Versuchstechnik

Die Netto-Resorption (Sekretion) von Na^+ , K^+ , Cl^- und H_2O in einem bestimmten Darmabschnitt wurde mit folgender in vivo-Methode (Scharrer und Hosser, 1980) untersucht: Die Ratte wurde mit einer Mischinjektion von Rompun^R (Xylazin-Hydrochlorid, Bayer Leverkusen, 11,7 mg/kg Körpergewicht) und Ketavet^R (Keta-min-Hydrochlorid, Parke Davis, München 50 mg/kg Körpergewicht), in die Oberschenkelmuskulatur narkotisiert. Danach wurde die Bauchhöhle im Bereich der Linea alba mit einem 4-5 cm langem Schnitt eröffnet. Das entsprechende Darmsegment wurde an beiden Enden mit chirurgischer Nähseide abgebunden. Die folgenden Darmabschnitte wurden im einzelnen untersucht: das proximale Jejunum (distal der Plica duodenocolica, ca 10 cm lang), das Ileum (cranial der Valvula ileocaecalis, ca 10 cm lang), das Colon ascendens (Abschnitt vom Ostium caecocolicum bis zum Colon transversum), das Colon descendens (caudal des Colon transversum bis etwa 3 cm proximal des Anus) und das Caecum. Pro Ratte wurde jeweils nur eines der genannten Darmsegmente präpariert. Innerhalb des ligierten Segments wurden neben den Ligaturen 2 kleine Einschnitte gemacht. Das Darmsegment wurde zuerst mit Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer (Tabelle 3) durchgespült, um den Darminhalt zu entfernen. Anschliessend wurde mit der jeweiligen Versuchslösung nachgespült. Sämtliche Lösungen wurden auf 37°C vorgewärmt. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Versuchslösungen ist im Ergebnis-Teil aufgeführt. Alle

Versuchslösungen enthielten 0,1 mmol/l Polyäthylenglykol 4000 und $4,6 \cdot 10^6$ Bq ^3H -markiertes PEG/l (^3H -PEG 4000, New England Nuclear, Boston, Mass., USA) als nicht resorbierbare Substanz. Anschliessend wurde das ausgespülte Darmsegment neben den Inzisionen zu einem Säckchen abgebunden, wobei mittels einer, in einen der Einschnitte eingeschobenen Kanüle die vorgewärmte Versuchslösung eingefüllt wurde. Die Bauchhöhle wurde anschliessend mit Wundklammern wieder verschlossen. Um eine Hypothermie der Ratte zu vermeiden, wurde diese auf einen thermostatisierten Operationstisch gelegt. Nach Ablauf der Versuchszeit, je nach Darmsegment 20-60min, wurden die Wundklammern entfernt, das Säckchen freipräpariert und der Inhalt in ein Reagenzglas entleert. Das Darmsegment wurde vom Gekröse abgetrennt und zur Bestimmung seines Trockengewichtes (DTG) 24h bei 60°C in einem Wärmeschrank getrocknet.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffers

NaCl	118,5 mmol/l
KCl	4,7 mmol/l
CaCl x 2 H ₂ O	2,5 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mmol/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2 mmol/l
NaHCO ₃	24,8 mmol/l

20 min mit Carbogen begasen ($\text{O}_2:\text{CO}_2 = 95:5$)

3.3. Bestimmung der Resorption der Elektrolyte

3.3.1. Aufarbeitung der Proben

Für die Konzentrationsbestimmung von Na^+ , K^+ und Cl^- wurden die aus den Darmsäckchen erhaltenen Proben zunächst 10-15 min bei 3000 U/min zentrifugiert, danach wurden im Ueberstand die Elektrolytkonzentrationen gemessen.

3.3.2. Messung der Elektrolytkonzentrationen

Die Na^+ - und K^+ -Konzentrationen wurden flammenphotometrisch (Instrumentation Laboratory Flame Photometer 243), die Cl^- -Konzentration titrimetrisch mit einem Chloridometer (Clotronic elvi 535, Milano, Italien) bestimmt.

3.3.3. Berechnung der Netto-Resorption (Sekretion) der Elektrolyte

Bei den im folgenden häufig verwendeten Begriffen Resorption bzw. Sekretion handelt es sich jeweils um die Nettoresorption (Nettosekretion) des entsprechenden Elektrolytes. Die Resorption bzw. Sekretion der jeweiligen Elektrolyte wurde aus den Konzentrationsänderungen der in die ligierten Darmsegmente eingebrachten Versuchslösung unter Berücksichtigung der Wasserresorption berechnet. Die Resorption (Sekretion) wurde auf 100 mg DTG bezogen. Zur Berücksichtigung der Volumenänderung der Elektrolytlösung im Darmlumen während der Versuchsdauer infolge der Wasserresorption wurde ^3H -markiertes Polyäthylenglykol (PEG 4000, New England Nuclear, Boston, Mass., USA) als nicht resorbierbare Substanz verwendet. Die ^3H -Aktivität (Impulse/min =

Ipm) wurde in 0,05 ml der jeweils zu messenden Probe nach Zugabe von 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Hydrotom, Kontron, Zürich) in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (BETAmatic, Kontron, Zürich) bestimmt.

Der Korrekturfaktor (f) für die Volumenänderung wird mit der folgenden Formel berechnet:

$$f = \frac{{}^3\text{H-Aktivität}_{\text{Vlsg}}}{{}^3\text{H-Aktivität}_{\text{Probe}}}$$

Zur Berechnung der Resorption der jeweiligen Elektrolyte diente die folgende Gleichung:

$$\begin{aligned} &\text{Resorbierte Substratmenge } (\mu\text{mol}/100\text{mg DTG}) = \\ &\frac{(S_{\text{Vlsg}} - f \times S_{\text{Probe}}) \times V \times 100}{\text{DTG}} \end{aligned}$$

- S_{Vlsg} = Anfangskonzentration der Elektrolyte ($\mu\text{mol}/\text{ml}$)
- S_{Probe} = Endkonzentration der Elektrolyte ($\mu\text{mol}/\text{ml}$)
- f = Korrekturfaktor für die Volumenänderung
- V = ins Säckchen eingefülltes Flüssigkeitsvolumen (ml)
- DTG = Darmtrockengewicht in mg

3.3.4. Berrechnung der Wasserresorption

Zur Berrechnung der Wasserresorption wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{H}_2\text{O-Resorption } (\mu\text{l}/100\text{mgDTG}) = \frac{(1-f) \times V \times 100}{\text{DTG}}$$

f = Korrekturfaktor für die Volumenänderung

V = ins Säckchen eingefülltes Volumen

DTG = Darmtrockengewicht in mg

3.4. Untersuchung der Harn- und Blutproben

3.4.1. Probengewinnung und Aufbereitung

Die Harnproben wurden nach frühesten 1-wöchiger Verfütterung der entsprechenden Diäten gewonnen. Dazu wurde der von den Ratten bei der Herausnahme aus dem Käfig spontan abgesetzte Harn in einem Wägeschälchen aufgefangen, in ein Reagenzglas überführt und innerhalb einer Stunde analysiert.

Die Blutproben wurden nach Beendigung des Versuchs am narkotisierten Tier aus der Bauchorta entnommen. Zur Plasmagewinnung wurden die heparinisierten Blutproben 10-15 min bei 3000 U/min zentrifugiert.

Die Messung der Na^+ , K^+ und Cl^- -Konzentrationen erfolgte wie unter 3.3.2.

Die Phosphat-(Plasma, Harn) und Harnstoffkonzentrationen wurden mit der jeweiligen Test-Kombination von Böhringer bestimmt (Phosphat: Nr. 124974, Harnstoff: Nr. 124770, Böhringer Mannheim GmbH).

Für die Messung des pH-Wertes und der Osmolarität des Harns wurden die Einzelproben gepoolt. Der pH wurde mit einem Metrohm- 632-pH Meter und die Osmolarität mit einem Knauer-Osmometer bestimmt.

3.4.2. Blutgasanalyse

Den mit Äther narkotisierten Ratten wurde aus der Bauchorta ca 2 ml Blut entnommen. Die dazu verwendeten Spritzen wurden zuvor mit Liquemin^R 5000 IU/ml (Hoffmann-La Roche) durchgespült, um eine Blutgerinnung zu vermeiden. Die Proben wurden bis zur Bestimmung auf Eis aufbewahrt (höchstens 30min). Die Blutgasanalyse erfolgte mit einem 168 pH/ Blood Gas Analyser (Corning).

3.5. Statistik

Alle Ergebnisse sind, wenn nicht anders bezeichnet, als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben ($\bar{x} \pm \text{SD}$). Die statistische Prüfung der Gruppenunterschiede auf Signifikanz erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test (Sachs, 1984). Als Signifikanzgrenze wurde $p < 0,05$ gewählt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Einfluss von Nitrat auf die Elektrolyt- und Wasserresorption normal ernährter Ratten

Der gekoppelten Na^+/Cl^- -Transport kann einerseits aus einem direkten Na^+/Cl^- -Cotransport, andererseits aus einem Na^+/H^+ - und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschmechanismus bestehen. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurde in Vorversuchen der Einfluss von Nitrat auf die Elektrolytresorption in verschiedenen Darmabschnitten näher untersucht. Nitrat hemmt den $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschmechanismus (Aronson und Seifter, 1983) und kann deshalb als Unterscheidungsmerkmal zwischen dem direkten Cotransport und dem doppelten Ionenaustauschmechanismus dienen.

Die Vorversuche zum Einfluss von NO_3^- auf die Cl^- -Resorption in verschiedenen Darmabschnitten wurden durchgeführt, um einen etwaigen Effekt einer Cl^- -Unterversorgung über das Futter auf die intestinale Cl^- -Resorption (siehe 4.5., Seite 33) dem $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschmechanismus oder dem Na^+/Cl^- -Cotransport zuzuordnen zu können.

Als Versuchslösung wurde Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer verwendet, bei welchem 25 mmol/l NaCl isomolar durch 25 mmol/l Na-Nitrat bzw. Na-Glukonat (Kontrolle) ersetzt wurde.

4.1.1. Dünndarm

Im proximalen Jejunum wurde die Elektrolytresorption (Na^+ , K^+ , Cl^-) durch Nitrat nicht signifikant beeinflusst, hingegen wurde die Wasserresorption durch Nitrat im Vergleich zu Glukonat signifikant ($p < 0,05$) erhöht (Abbildung 1). Eine gleichsinnige Tendenz ergab sich für die Na^+ -Resorption. Im Ileum war weder die

Na^+ - und Cl^- -Resorption und K^+ -Sekretion noch die Wasserresorption zwischen den beiden Versuchsgruppen verschieden (Abbildung 2).

4.1.2. Colon

Im Colon ascendens wurde durch Nitrat sowohl die Na^+ - als auch die Cl^- -Resorption signifikant ($p < 0,05$) erniedrigt (Abbildung 3). Für die Wasserresorption ergab sich eine entsprechende Tendenz. Die K^+ -Sekretion blieb durch NO_3^- unbeeinflusst. Im Colon descendens war die Cl^- -Resorption in Gegenwart von Nitrat signifikant ($p < 0,05$) erniedrigt (Abbildung 4). Die Na^+ - und Wasserresorption wurden in diesem Darmabschnitt durch NO_3^- nicht signifikant beeinflusst. Die Tendenz einer Hemmung durch Nitrat ist allerdings erkennbar. Auch die im Colon descendens erfolgende Resorption von K^+ wurde durch NO_3^- nicht signifikant beeinflusst.

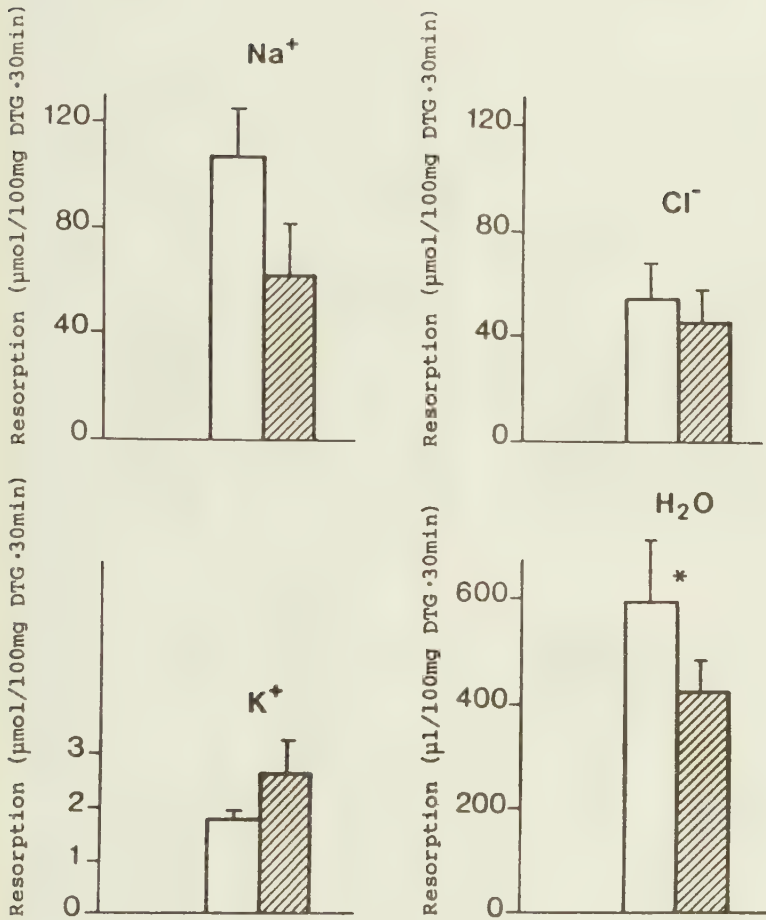


Abbildung 1: Einfluss von Nitrat auf den Elektrolyt- und Wassertransport im proximalen Jejunum

Versuchslösung: Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer mit 25 mmol/l Nitrat □ (n=6), bzw. mit 25 mmol/l Glukonat ▨ (n=6)

* Unterschied signifikant (p<0,05)

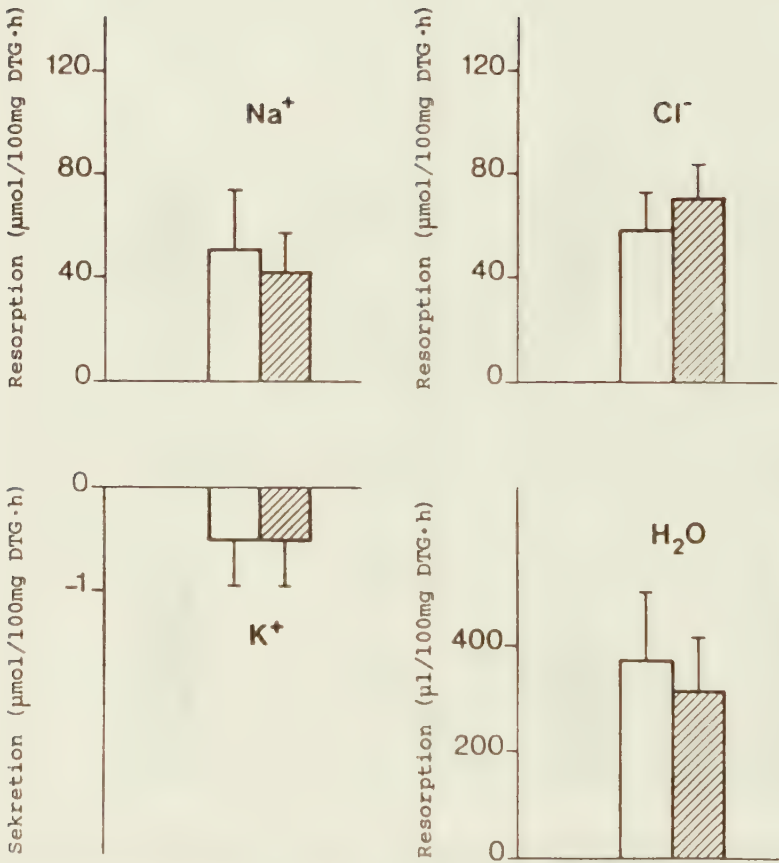


Abbildung 2: Einfluss von Nitrat auf den Elektrolyt- und Wassertransport im Ileum
Versuchslösung: Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer mit 25 mmol/l Nitrat □ (n=10), bzw. mit 25 mmol/l Glukonat ▨ (n=10)

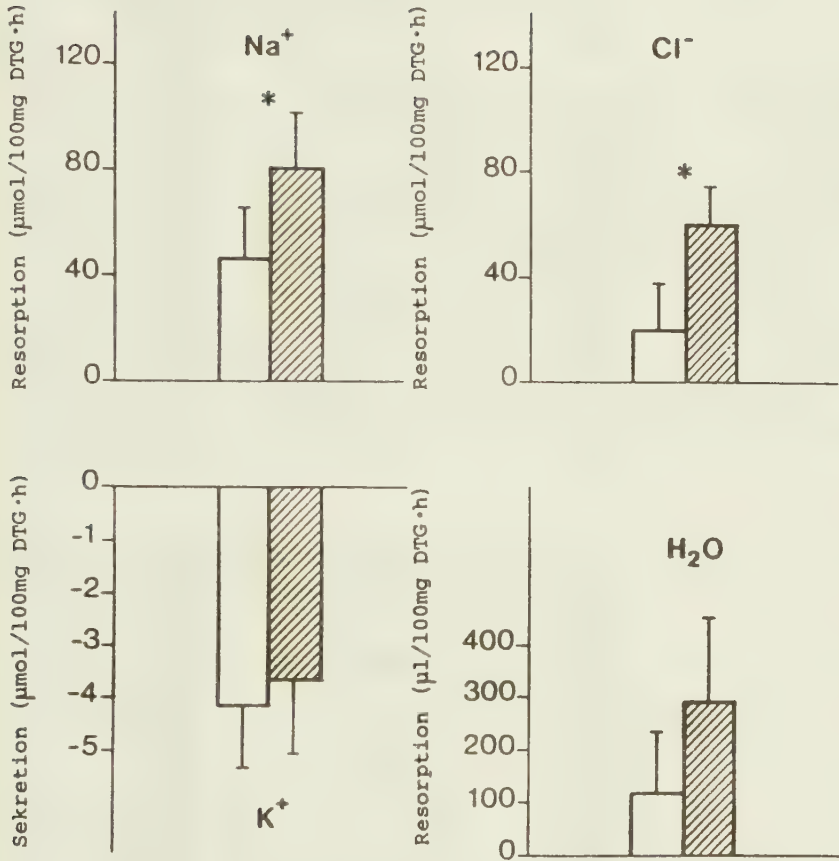


Abbildung 3: Einfluss von Nitrat auf den Elektrolyt- und Wassertransport im Colon ascendens

Versuchslösung: Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer mit 25 mmol/l Nitrat □ (n=5), bzw. mit 25 mmol/l Glukonat ▨ (n=5)

* Unterschiede signifikant (p<0,05)

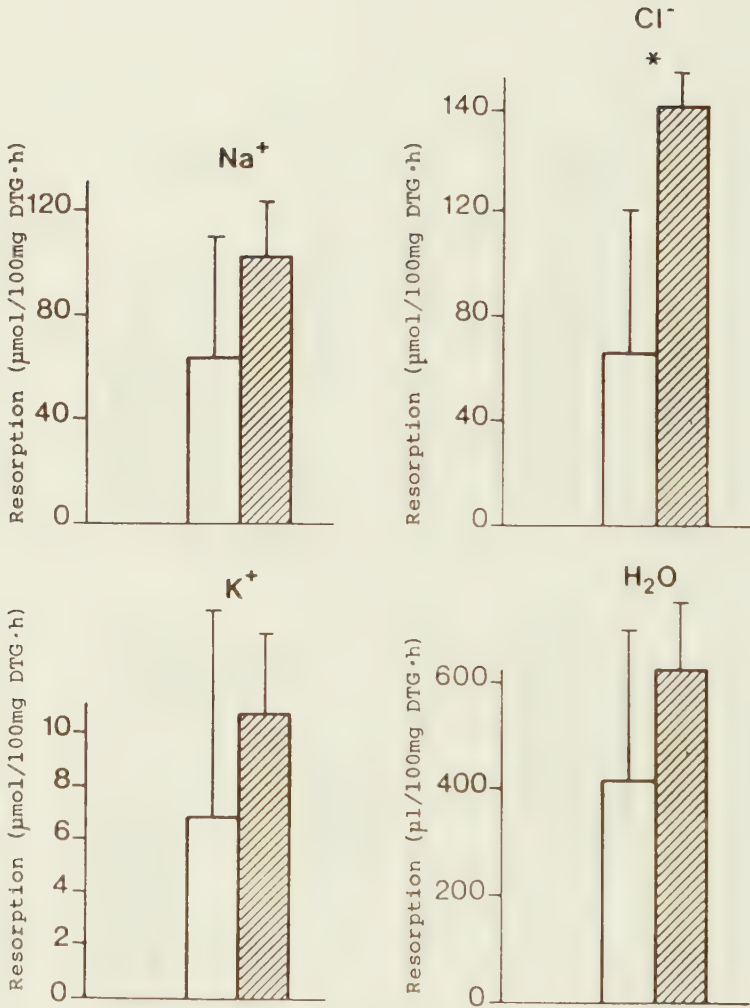


Abbildung 4: Einfluss von Nitrat auf den Elektrolyt- und Wassertransport im Colon descendens

Versuchslösung: Krebs-Henseleit-Ricarbonat-Puffer mit 25 mmol/l Nitrat □ (n=5), bzw. mit 25 mmol/l Glukonat ▨ (n=4)

* Unterschied signifikant (p<0,05)

4.2. Wachstum und Futteraufnahme der Tiere bei Fütterung mit einer Cl^- -armen Diät

Bei den Tieren mit einem Anfangsgewicht von 58g waren die tägliche Futteraufnahme (Tabelle 4) und Gewichtszunahme (Abbildung 5) der Tiere, welche die Cl^- -arme Diät erhielten, im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant geringer. Die Wasseraufnahme in dieser Gruppe war zwischen Cl^- -Mangel- und Kontrolltieren nicht verschieden (Tabelle 4). Bei den adulten Tieren zeigten sich während der 2-wöchigen Aufnahme der Cl^- -armen Diät (Cl^- -Mangeltiere) bzw. Kontrolldiät (Kontrolltiere) keine signifikanten Unterschiede in der täglichen Futter- und Wasseraufnahme (Tabelle 4). Abbildung 6 zeigt die Gewichtszunahme über den Zeitraum von 14 Tagen, für die sich ebenfalls kein signifikanter Gruppenunterschied ergab.

Tabelle 4: Futter- und Wasseraufnahme nach 14-tägiger Fütterung mit der Cl^- -armen Diät bzw. Kontrolldiät

Adulte Ratten

	Cl^- -Mangeltiere (n= 10)	Kontrolltiere (n= 10)
Futteraufnahme (g)	23 $\pm$ 3	26 $\pm$ 4
Wasseraufnahme (ml)	30 $\pm$ 15	23 $\pm$ 5

Juvenile Ratten

	(n= 10)	(n= 10)
Futteraufnahme (g)	15 $\pm$ 2	19 $\pm$ 3*
Wasseraufnahme (ml)	18 $\pm$ 6	22 $\pm$ 7

* signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Fütterungsgruppen



Abbildung 5: Gewichtsentwicklung bei juvenilen Ratten

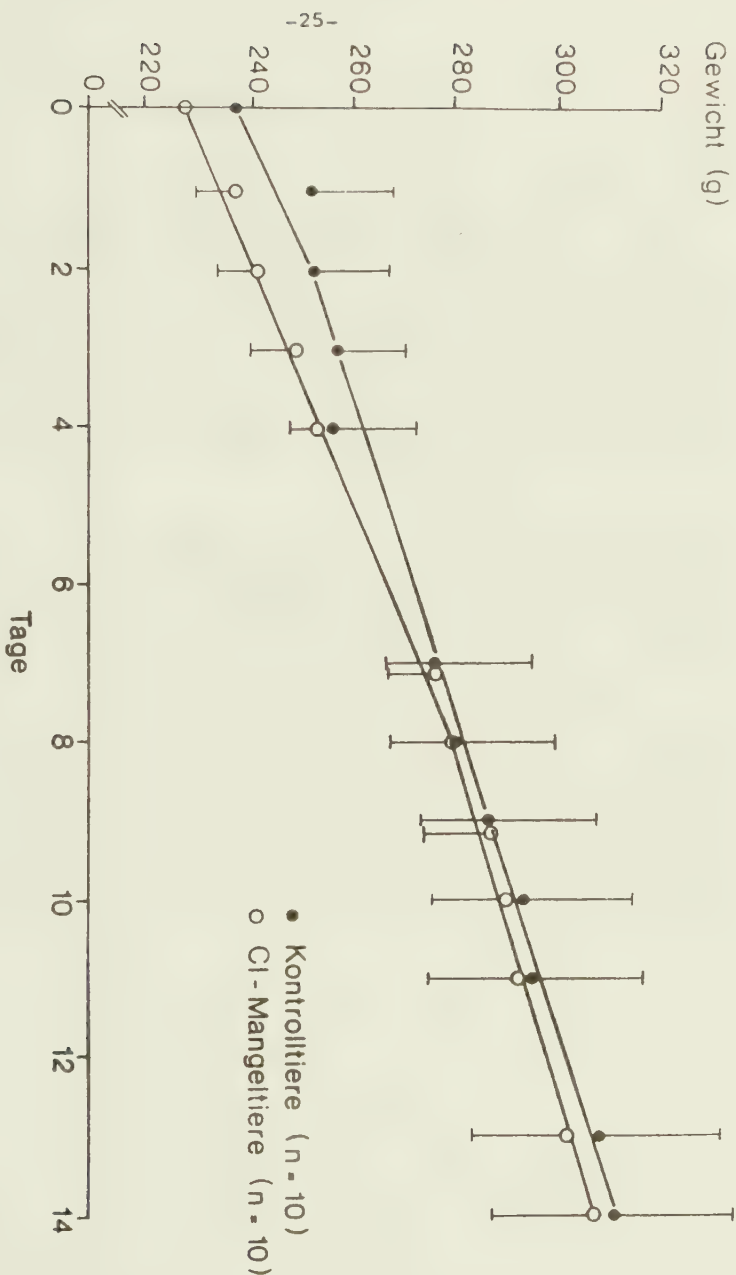


Abbildung 6: Gewichtsentwicklung bei adulten Ratten

4.3. Blutwerte

Bei den adulten Tieren ergaben sich nach 14-tägiger Verfütterung der entsprechenden Diäten nur in Bezug auf die Plasma- K^+ -Konzentration Unterschiede zwischen Cl^- -Mangel- und Kontrolltieren. Die Plasma- K^+ -Konzentration war bei den Cl^- -Mangeltieren signifikant ($p < 0,002$) tiefer als bei den Kontrolltieren (Tabelle 5). Für die Plasmakonzentrationen von Cl^- , Na^+ , Mg^{++} , Ca^{++} und anorganischem Phosphat wurden keine signifikanten Gruppenunterschiede gefunden.

Bei den juvenilen Cl^- -Mangeltieren ergaben sich im Vergleich zu den Kontrolltieren neben einer signifikant ($p < 0,002$) niedrigeren Plasma- K^+ -Konzentration auch eine signifikant ($p < 0,002$) niedrigere Plasma- Cl^- -Konzentration (Tabelle 6).

Die Blutgasanalyse, die den pH-Wert, den partiellen CO_2 - und O_2 -Druck (pCO_2 , pO_2), die HCO_3^- -Konzentration, die totale CO_2 -Konzentration (TCO_2), den Basenexzess (BE) und die Hb-Konzentration umfasste, wurde nur bei adulten Tieren durchgeführt und ergab keinen Unterschied zwischen den Cl^- -Mangel- und Kontrolltieren (Tabelle 7). Allerdings deuteten sich bezüglich des BE bei den Cl^- -Mangeltieren im Vergleich zu den Kontrolltieren niedrigere Werte an.

Tabelle 5: Einfluss einer Cl⁻-armen Diät auf die Elektrolytkonzentrationen im Plasma bei adulten Ratten

	Cl ⁻ -Mangeltiere	Kontrolltiere
Na ⁺ (mmol/l)	138 ± 2 (37)*	137 ± 6 (35)
K ⁺ (mmol/l)	5,1 ± 0,5 (37)	6,0 ± 0,3 (35)**
Mg ⁺⁺ (mmol/l)	0,87 ± 0,08 (7)	0,91 ± 0,11 (8)
Ca ⁺⁺ (mmol/l)	2,62 ± 0,08 (12)	2,64 ± 0,06 (12)
Cl ⁻ (mmol/l)	102 ± 4 (41)	103 ± 3 (38)
Phosphat (mmol/l)	2,52 ± 0,39 (12)	2,45 ± 0,45 (12)

* Anzahl der Tiere in Klammern

** Unterschied signifikant p<0,002

Tabelle 6: Einfluss einer Cl⁻-armen Diät auf die Elektrolytkonzentrationen im Plasma bei juvenilen Ratten

	Cl ⁻ -Mangeltiere	Kontrolltiere
Na ⁺ (mmol/l)	138 ± 3 (23)*	139 ± 1 (22)
K ⁺ (mmol/l)	5,1 ± 0,6 (23)	6,2 ± 0,4 (22)**
Mg ⁺⁺ (mmol/l)	0,81 ± 0,13 (6)	0,96 ± 0,09 (8)
Cl ⁻ (mmol/l)	100 ± 5 (23)	107 ± 4 (22)**

* Anzahl der Tiere in Klammern

** Unterschiede signifikant p<0,002

Tabelle 7: Blutgasanalyse bei Cl⁻-Mangel- und Kontrolltieren

	Cl ⁻ -Mangeltiere	Kontrolltiere
pH	7,488 ± 0,035	7,460 ± 0,040
pCO ₂ (mmHg)	36,2 ± 5,3	37,0 ± 4,0
pO ₂ (mmHg)	80,7 ± 15,4	77,8 ± 14,7
HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	27,2 ± 1,7	26,2 ± 1,0
TCO ₂ (mmol/l) ¹	28,3 ± 1,9	27,4 ± 1,1
BE (mmol/l) ²	5,0 ± 0,5	3,4 ± 1,3
Hb (g/l)	16,7 ± 0,7	16,4 ± 0,6

Anzahl Tiere: Cl⁻-Mangeltiere: 3

Kontrolltiere : 5

¹ Total-CO₂

² Basenexzess

4.4. Harnwerte

Um den Effekt der Cl^- -armen Diät auf die Elektrolytausscheidung im Harn zu überprüfen, wurde nach einer einwöchigen Vorfütterung mit den entsprechenden Diäten bei den Cl^- -Mangel- und Kontrolltieren Harnproben gewonnen.

Die Konzentration der Elektrolyte Na^+ , K^+ und Cl^- wurde sowohl im Urin von adulten als auch von juvenilen Ratten untersucht. Dabei war die Cl^- -Konzentration im Urin der Cl^- -Mangeltiere bei der Altersgruppen signifikant ($p < 0,002$) niedriger als bei den entsprechenden Kontrolltieren. Sowohl die Na^+ - als auch die K^+ -Konzentration im Harn zeigte keinen Unterschied in Abhängigkeit von der Fütterung (Tabelle 8 und 9).

Die Mg^{++} -Ausscheidung über den Urin wurde nur bei den juvenilen Ratten untersucht und unterschied sich nicht signifikant zwischen Cl^- -Mangel- und Kontrolltieren (Tabelle 9).

Im Urin der adulten Tiere wurde zusätzlich die Phosphat- und Harnstoffkonzentration, die Osmolarität sowie der pH-Wert bestimmt. Einzig der pH-Wert war bei den Cl^- -Mangeltieren signifikant ($p < 0,01$) höher als bei den Kontrolltieren. Die Harnstoff- und Phosphatkonzentration, sowie die Osmolarität unterschieden sich nicht zwischen den beiden Fütterungsgruppen.

Tabelle 8: Einfluss einer Cl⁻-armen Diät auf die Harnzusammensetzung bei adulten Ratten

	Cl ⁻ -Mangeltiere	Kontrolltiere
Na ⁺ (mmol/l)	111 ± 88 (7)*	108 ± 81 (10)
K ⁺ (mmol/l)	65 ± 51 (4)	88 ± 108 (5)
Cl ⁻ (mmol/l)	12 ± 10 (26)	173 ± 82 (20)**
Phosphat (mmol/l)	35,1 ± 44,3 (23)	35,3 ± 39,1 (28)
Harnstoff (mmol/l)	325 ± 178 (13)	314 ± 145 (12)
Osmolarität (mosm/l)	911 ± 383 (3)	749 ± 62 (3)
pH	7,48 ± 0,21 (5)	6,67 ± 0,05 (5)***

* Anzahl der Urinproben

** Unterschied signifikant p<0,002

*** Unterschied signifikant p<0,01

Tabelle 9: Einfluss einer Cl^- -armen Diät auf die Harnzusammensetzung bei juvenilen Ratten

	Cl^- -Mangeltiere	Kontrolltiere
Na^+ (mmol/l)	79 ± 57 (35)*	93 ± 76 (30)
K^+ (mmol/l)	76 ± 37 (35)	79 ± 50 (30)
Mg^{++} (mmol/l)	$25,4 \pm 15,3$ (5)	$19,7 \pm 15,4$ (6)
Cl^- (mmol/l)	11 ± 10 (44)	130 ± 100 (36)**

* Anzahl der Urinproben

** Unterschied signifikant $p < 0,002$

4.5. Einfluss einer Cl^- -armen Diät auf die Elektrolyt- und Wasserresorption in verschiedenen Darmabschnitten

Die Elektrolyt- (Na^+ , K^+ , Cl^-) und Wasserresorption wurde in verschiedenen Darmabschnitten von Ratten, die entweder mit einer Cl^- -armen oder Kontroll-Diät gefüttert wurden, untersucht. Als Versuchslösung diente, wenn nicht anders erwähnt, Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer (Tabelle 3).

Im Ileum wurden die Versuche zur Elektrolyt- und Wasserresorption sowohl mit adulten als auch mit juvenilen Ratten durchgeführt. Wie aus den Tabellen 10 und 11 hervorgeht, beeinflusste die Cl^- -Mangeldiät in diesem Darmabschnitt die Elektrolyt- und Wasserresorption weder bei den adulten noch bei den juvenilen Tieren.

Im proximalen Jejunum wurde die Elektrolyt- und Wasserresorption bei adulten Tieren untersucht. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Cl^- -Mangel- und Kontrolltieren (Tabelle 12)

Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ergaben sich für die Elektrolyt- und Wasserresorption im Colon ascendens (Tabelle 13) und Colon descendens (Tabelle 14) zwischen Cl^- -Mangel- und Kontrolltieren. Auch für diese Versuche wurden adulte Ratten verwendet.

Tabelle 10: Einfluss einer Cl^- -armen Diät auf die Netto-Resorption von Na^+ , K^+ , Cl^- und H_2O im Ileum juveniler Ratten

	Elektrolytresorption ($\mu\text{mol}/100\text{mgDTG} \times 45\text{min}$)	Cl^- -arme Diät	Kontrolldiät
H_2O -Resorption ($\mu\text{l}/100\text{mgDTG} \times 45\text{min}$)			
Na^+		$87 \pm 26 \quad (10)^*$	$90 \pm 16 \quad (10)$
K^+		$4,6 \pm 1,3 \quad (10)$	$3,8 \pm 1,0 \quad (10)$
Cl^-		$110 \pm 37 \quad (10)$	$114 \pm 23 \quad (10)$
H_2O		$582 \pm 180 \quad (10)$	$610 \pm 115 \quad (10)$

* Anzahl der Tiere in Klammern

Tabelle 11: Einfluss einer Cl⁻-armen Diät auf die Netto-Resorption von Na⁺, K⁺, Cl⁻ und H₂O im Ileum adulter Ratten

Elektrolytresorption (μ mol/100mgDTG x 45min) H ₂ -Resorption (μ l/100mgDTG x 45min)	Cl ⁻ -arme Diät		Kontrolldiät	
Na ⁺	75 $\pm$ 22 (10)*		81 $\pm$ 13 (10)	
K ⁺	3,2 $\pm$ 1,2 (10)		3,4 $\pm$ 0,9 (10)	
Cl ⁻	91 $\pm$ 25 (10)		100 $\pm$ 18 (10)	
H ₂ O	530 $\pm$ 148 (10)		558 $\pm$ 85 (10)	

* Anzahl der Tiere in Klammern

Tabelle 12: Einfluss einer Cl^- -armen Diät auf die Nettoresorption von Na^+ , K^+ , Cl^- und H_2O im proximalen Jejunum

	Elektroytresorption ($\mu\text{mol}/100\text{mgDTG} \times 20\text{min}$)	Cl^- -arme Diät	Kontrolldiät
H_2O -Resorption ($\mu\text{l}/100\text{mgDTG} \times 20\text{min}$)			
Na^+		48 ± 15 (6)*	48 ± 9 (6)
K^+		$2,9 \pm 0,7$ (6)	$2,7 \pm 0,5$ (6)
Cl^-		40 ± 14 (6)	39 ± 9 (6)
H_2O		299 ± 88 (6)	299 ± 65 (6)

* Anzahl der Tiere in Klammern

Tabelle 13: Einfluss einer Cl^- -armen Diät auf die Netto-Resorption (Sekretion) von Na^+ , K^+ , Cl^- und H_2O im Colon ascendens

	Cl^- -arme Diät	Kontrolldiät
Elektrolytresorption (Sekretion)		
($\mu\text{mol}/100\text{mgDTG} \times \text{h}$)		
H_2O -Resorption ($\mu\text{l}/100\text{mgDTG} \times \text{h}$)		
Na^+	$118 \pm 24 \quad (5)^*$	$125 \pm 14 \quad (4)$
K^+	$-2,9 \pm 1,9^1 \quad (5)$	$-2,2 \pm 1,9 \quad (4)$
Cl^-	$104 \pm 196 \quad (5)$	$112 \pm 24 \quad (4)$
H_2O	$455 \pm 196 \quad (5)$	$573 \pm 188 \quad (4)$

* Anzahl der Tiere in Klammern

¹ Werte mit negativen Vorzeichen = Sekretion

Tabelle 14: Einfluss einer Cl^- -armen Diät auf die Netto-Resorption von Na^+ , K^+ , Cl^- und H_2O
im Colon descendens

	Elektrolytresorption ($\mu\text{mol}/100\text{mgDTG} \times \text{h}$)	Cl^- -arme Diät	Kontrolldiät
H_2O -Resorption ($\mu\text{l}/100\text{mgDTG} \times \text{h}$)			
Na^+		79 ± 44 (10)*	89 ± 48 (10)
K^+		$8,8 \pm 6,2$ (10)	$7,8 \pm 5,6$ (10)
Cl^-		126 ± 34 (10)	119 ± 45 (10)
H_2O		359 ± 236 (10)	377 ± 297 (10)

* Anzahl der Tiere in Klammern

Die Elektrolyt- und Wasserresorption im Caecum wurde an juvenilen Ratten untersucht. Um einen eventuellen Einfluss von flüchtigen Fettsäuren, die unter physiologischen Bedingungen in diesem Darmabschnitt in hohen Konzentrationen auftreten, zu berücksichtigen, wurde hier im Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer 50 mmol/l NaCl durch 50 mmol/l Na-Acetat bzw. Na-Glukonat (=Kontrolle) ersetzt. Auch in diesem Experiment zeigten sich keine Gruppenunterschiede in der Elektrolyt- und Wasserresorption, weder in Bezug auf Acetat, noch hinsichtlich der Fütterung (Tabelle 15).

Tabelle 15: Einfluss einer Cl^- -armen Diät auf die Netto-Resorption (Sekretion) von Na^+ , K^+ , Cl^- und H_2O im Caecum

Elektrolytresorption (Sekretion) ($\mu\text{mol}/100\text{mgDTG} \times \text{h}$) H_2O -Resorption ($\mu\text{l}/100\text{mgDTG} \times \text{h}$)	Cl^- -arme Diät		Kontrolldiät	
	Acetat ¹	Glukonat ²	Acetat	Glukonat
Na^+	95 $\pm$ 19 (8) ³	82 $\pm$ 12 (5)	95 $\pm$ 24 (5)	65 $\pm$ 25 (6)
K^+	-2,9 $\pm$ 1,1 ⁴ (8)	-2,1 $\pm$ 1,4 (5)	-3,2 $\pm$ 1,4 (5)	-4,0 $\pm$ 1,3 (6)
Cl^-	140 $\pm$ 26 (8)	150 $\pm$ 17 (5)	127 $\pm$ 19 (5)	146 $\pm$ 43 (6)
H_2O	582 $\pm$ 147 (8)	445 $\pm$ 151 (5)	544 $\pm$ 132 (5)	362 $\pm$ 119 (6)

¹ Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer mit 50mmol/l Acetat

² Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer mit 50mmol/l Glukonat

³ Anzahl der Tiere in Klammern

⁴ Werte mit negativen Vorzeichen = Sekretion

5. DISKUSSION

Zunächst soll der Einfluss von Nitrat auf den Elektrolyttransport in verschiedenen Darmabschnitten diskutiert werden. Anschliessend werden die Auswirkungen einer Cl^- -armen Ernährung auf den Elektrolythaushalt erörtert.

Die Mechanismen des gekoppelten Na^+/Cl^- -Transportes in verschiedenen Darmabschnitten der Ratte sind noch nicht vollständig geklärt. Der gekoppelte Na^+/Cl^- -Transport kann entweder aus einem direkten Na^+/Cl^- -Cotransport und/oder aus einem doppelten Ionenaustauschmechanismus, der sich aus einem Na^+/H^+ und einem $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschmechanismus zusammensetzt, bestehen (Powell und Fan, 1984). Nitrat kann zur Unterscheidung zwischen dem direkten Cotransport und dem doppelten Ionenaustauschmechanismus dienen, da durch Nitrat der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschmechanismus gehemmt wird (Aronson und Seifter, 1983). Dies geschieht entweder über eine Hemmung der Carboanhydrase (Frizzell et al., 1973) oder durch eine kompetitive Wirkung auf den Anionenaustauscher (Aronson und Seifter, 1984).

Im proximalen Jejunum der Ratte zeigte Nitrat in unseren Versuchen keinen Effekt auf den Na^+ und Cl^- -Transport. Die bei Anwesenheit von NO_3^- in der Versuchslösung erhöhte Wasserresorption kann anhand der vorliegenden Resultate nicht definitiv erklärt werden. Allerdings erfolgt die Resorption von Glukonat (=Kontrolle) im Vergleich zu Nitrat wahrscheinlich nur sehr langsam, so dass Glukonat als osmotisch aktive und damit die Wasserresorption hemmende Substanz im Darmlumen verbleibt. Da im Jejunum eine isotone Resorption stattfindet (Schultz, 1981), wäre dies eine mögliche Erklärung für die verminderte Wasserresorption in Gegenwart von Glukonat.

Der fehlende Einfluss von Nitrat auf die Na^+ und Cl^- -Resorption im Ileum deutet darauf hin, dass der in der Literatur für das Kaninchenileum beschriebene doppelte Ionenaustauschmechanismus (Knickelbein et al, 1983 und 1985) bei der Ratte zumindest quantitativ keine grosse Rolle spielt.

Im Colon ascendens wurde sowohl die Na^+ -als auch die Cl^- -Resorption signifikant gehemmt. Erklären liesse sich dieser Befund durch das Vorhandensein eines gekoppelten Na^+/Cl^- -Transports, falls dieser aus einem doppelten Ionenaustauschmechanismus ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ und Na^+/H^+) besteht. Die signifikante Hemmung des Cl^- -Transportes im Colon descendens in Gegenwart von Nitrat könnte durch eine Hemmung eines $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Ionenaustauschers bedingt sein. Ein solcher Austauschmechanismus wurde von Frizzell et al. (1976) für das Colon descendens des Kaninchens beschrieben.

Mit Hilfe einer Cl^- -armen Diät wurde versucht, bei Ratten einen Cl^- -Mangel zu erzeugen, um mögliche kompensatorische Reaktionen des Körpers, insbesondere des Darmes und der Niere, auf eine Cl^- -Unterversorgung genauer untersuchen zu können. Die metabolischen Konsequenzen eines extremen Cl^- -Mangels sind neben einer Hypochloridämie, eine Alkalose sowie eine Hypokalämie (Simpoulos und Bartter, 1980), da Körperzellen bei einer Alkalose intrazelluläre Protonen gegen extrazelluläres K^+ austauschen.

Die Versuche mit der Cl^- -armen Diät (0,05% Cl^- gegenüber 0,46% in der Kontrolldiät) zeigen, dass bei adulten Tieren eine manifeste Cl^- -Depletion im Sinne einer Erniedrigung der Plasma- Cl^- -Konzentration nur schwer erreichbar ist, da bei den adulten Cl^- -Mangeltieren lediglich der Plasma- K^+ -Spiegel nicht aber der Plasma- Cl^- -Spiegel erniedrigt war. Dies deutet auf eine kompensierte Alkalose hin (s. oben). Dafür sprechen auch die Ergeb-

nisse der Blutgasanalytik. Bei den noch im Wachstum befindlichen juvenilen Tieren war bei Fütterung der Cl^- -Mangeldiät neben der Plasma- K^+ -Konzentration auch die Plasma- Cl^- -Konzentration erniedrigt. Ferner war die Futteraufnahme und das Wachstum verringert. Somit reagieren junge Tiere auf eine Cl^- -Unterversorgung empfindlicher als adulte Tiere. Dies ist nicht verwunderlich, da der Nährstoffbedarf wachsender Tiere selbstverständlich generell höher ist als derjenige adulter Tiere.

Die Cl^- -Konzentration des Harns war bereits nach einwöchiger Fütterung der Cl^- -armen Diät deutlich erniedrigt. Dies steht in Übereinstimmung mit den von Fettman et al. (1984) beschriebenen Versuchen an Milchkühen, welche auf eine Cl^- -Mangeldiät mit einer reduzierten Plasma- Cl^- -Konzentration und einer reduzierten Cl^- -Ausscheidung im Harn reagierten. Als mögliche Ursachen für die reduzierte Cl^- -Ausscheidung in unseren Versuchen kommen eine verminderte glomeruläre Filtrationsrate (GFR) oder eine vermehrte Rückresorption in Frage. Eine verminderte GFR bei den Cl^- -Mangeltieren scheint unwahrscheinlich, da von den Elektrolyten (Na^+ , K^+ , Cl^-) nur die Cl^- -Konzentration des Harns, nicht aber die Konzentration der andern Elektrolyte im Harn im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt war. Eine vermehrte Rückresorption kann im proximalen Tubulus, in der Henleschen Schleife, im distalen Tubulus sowie im Sammelrohr stattfinden, da in diesen Abschnitten des Nephrons die Rückresorption von glomerulär filtrierte Substanzen und von Wasser stattfindet. Im proximalen Tubulus ist eine Stimulation der Cl^- -Resorption unwahrscheinlich, da bei Cl^- armer Fütterung nur die Cl^- -Konzentration des Harns, nicht jedoch die Na^+ -Konzentration massiv reduziert war und in diesem Abschnitt Cl^- gekoppelt mit Na^+ resorbiert wird. Im aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife kann der $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ -Cotransport z.B. durch das antidiuretische Hormon stimuliert werden (Greger 1985). Da jedoch auch in diesem Abschnitt des Nephrons die Cl^- -Resorption mit derjenigen

von Na^+ gekoppelt ist, scheint eine vermehrte Rückresorption von Cl^- an dieser Stelle ebenfalls unwahrscheinlich.

Im Sammelrohr kann bei einer Alkalose die HCO_3^- -Sekretion stimuliert werden (McKinney und Burg, 1977, Garcia-Autt, 1985). Diese Sekretion ist möglicherweise gekoppelt mit der Resorption von Cl^- (McKinney und Burg, 1977). Eine Stimulation dieses Mechanismus im Cl^- -Mangel würde auch den signifikant höheren pH-Wert des Urins der Cl^- -Mangeltiere erklären. Die letzte Möglichkeit ist somit die wahrscheinlichste.

Die Elektrolytresorption im Dün- und Dickdarm (proximales Jejunum, Ileum, Colon ascendens, Colon descendens, Caecum) zeigte keine Unterschiede zwischen den Cl^- -Mangel- und Kontrolltieren. Der Darm scheint deshalb an der Aufrechterhaltung der Cl^- -Homöostase bei mässiger alimentärer Cl^- -Unterversorgung nicht beteiligt zu sein, so dass die Cl-Homöostase unter diesen Umständen offenbar über eine Adaptation der renalen Cl^- -Resorptionsmechanismen aufrechterhalten wird.

Durch die vorliegenden Untersuchungen lässt sich allerdings nicht ausschliessen, dass bei ausgeprägterem Cl^- -Mangel auch der Darm für die Aufrechterhaltung der Chloridhomöostase eine Rolle spielt. Dies muss in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Regulation des intestinalen und renalen Cl^- -Transportes. Dabei wurden zunächst zur näheren Charakterisierung der in verschiedenen Darmabschnitten vorhandenen Cl^- -Transportmechanismen geprüft, inwieweit Nitrat, ein Inhibitor des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschmechanismus, die Cl^- -Resorption hemmt. Anschliessend wurde die Auswirkung eines alimentären Cl^- -Mangels auf die intestinale Resorption von Elektrolyten (Cl^- , Na^+ , K^+), sowie auf die Elektrolytkonzentrationen des Plasmas und Harns untersucht.

Dabei wurden folgende Befunde erhoben:

- Nitrat beeinflusste die Resorption von Cl^- , Na^+ und K^+ im Dünndarm nicht. Im Colon ascendens hingegen wurde sowohl die Netto- Na^+ - als auch die Netto- Cl^- -Resorption durch Nitrat signifikant gehemmt. Im Colon descendens hingegen wurde durch Nitrat lediglich die Netto- Cl^- -Resorption signifikant reduziert.
- Während bei Cl^- -depletierten adulten Ratten nur die Plasma- K^+ -Konzentration gegenüber den Kontrolltieren reduziert war, war bei den Cl^- -depletierten juvenilen Ratten die Plasma- K^+ - und Cl^- -Konzentration erniedrigt.
- Der Futterverzehr und die Gewichtszunahme mit der Cl^- -armen Diät juveniler ernährter Ratten, war gegenüber den Kontrolltieren signifikant verringert. Bei adulten Tieren ergaben sich diesbezüglich keine Gruppenunterschiede.
- Nach einwöchiger Verfütterung der Cl^- -armen Diät war die Cl^- -Konzentration des Harns gegenüber denjenigen der Kontrolltiere signifikant reduziert, während der pH-Wert des Harns erhöht war.
- Die Elektrolytresorption unterschied sich in keinem der untersuchten Darmabschnitte (proximales Jejunum, Ileum, Colon

ascendens, Colon descendens, Caecum) zwischen Cl^- -Mangel- und Kontrolltieren.

Die Hemmung der Na^+ und Cl^- -Resorption im Colon ascendens durch Nitrat weist darauf hin, dass die gekoppelte Na^+/Cl^- -Resorption in diesem Darmabschnitt aus einem doppelten Ionenaustauschmechanismus besteht. Die Hemmung der Cl^- -Resorption im Colon descendens durch Nitrat, deutet darauf hin, dass Cl^- im Colon descendens überwiegend durch den $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschmechanismus resorbiert wird.

Ein Cl^- -Mangel wird aufgrund der erhaltenen Ergebnisse offenbar vor allem durch eine gesteigerte renale Cl^- -Rückresorption kompensiert. Die intestinale Cl^- -Resorption scheint diesbezüglich keine Rolle zu spielen.

Summary

The aim of the present study was to investigate the regulation of the intestinal and renal Cl^- -transport. To characterize the different Cl^- -transport mechanism in different intestinal segments the influence of nitrate, an inhibitor of the $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange mechanism, on electrolyte transport was examined. Furthermore the effect of a alimentary Cl^- deficiency on intestinal electrolyte transport (Na^+ , K^+ , Cl^-) and on plasma and urin concentration of these electrolytes was investigated.

The following results were obtained:

- Nitrate had no effect on electrolyte absorption in the small intestine, but reduced Na^+ and Cl^- absorption in the colon ascendens and Cl^- absorption in the colon descendens.
- Feeding a low chloride diet (LC-diet) for about 2 waeeks resulted in a decrease in plasma K^+ -concentration in young as well as in adult rats, whereas plasma Cl^- -concentration was reduced only in the young animals.
- The body weight gain in young rats fed the LC-diet was significantly lower compaired with that of the control rats. In the adult rats the LC-diet had no influence on body weight gain.
- Urinary Cl^- -concentration was significantly reduced in rats fed the LC-diet for about 1 week. Additionally the pH-value of the urine was significantly increased in the LC-rats compaired with the controls.
- Intestinal electrolyte transport was not affected by feeding the LC-diet.

Beacause of the inhibition of the Na^+ and Cl^- absorption by nitrate in the colon ascendens a dual ion exchange mechanism (Na^+/H^+ and $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) is probably operating at this intestinal

site. The decrease of the Cl^- absorption in the colon descends in the presence of nitrate might be due to an inhibition of the $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange mechanism.

According to our results an increase in renal Cl^- resorption seems to be instrumental in the maintenance of Cl^- -homeostasis in rats fed a LC-diet. Under our experimental conditions the intestine apparently does not play an important role in maintenance in Cl^- homeostasis.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- ALPERN, R.J., K.J. HOWLIN and P.A. PREISIG (1985): Active and passive components of the chloride transport in rat proximal convoluted tubule.
J. Clin. Invest. 76, 1360-1366
- ARONSON, P.S. and J. SEIFTER (1984): Cl^- -transport via anion exchange.
In: Ion transport processes in apical membranes of epithelia (Ed.: D.G. Warnock) Symposium Summary, Fed. Proc. 43, 2483-2484
- BINDER, H.J. and C.L. RAWLINS (1973): Electrolyte transport across isolated large intestinal mucosa.
Am. J. Physiol. 225, 1232-1239
- CASSANO, G., B. STIEGER and H. MURER (1984): Na^+/H^+ - and $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -exchange in rat jejunal and rat proximal tubular brush border membrane vesicles.
Pflügers Arch. 400, 309-317
- CHARNEY, A.N., and G.M. FELDMAN (1984). Systemic acid-base disorders and intestinal electrolyte transport.
Am. J. Physiol. 247, G1-G12
- FRIZZELL, R.A., H.N. NELLANS, R.C. ROSE, L. MARKSCHEID-KASPI and S.G. SCHULTZ (1973): Intracellular Cl^- -concentration and influxes across the brush borders of rabbit ileum.
Am. J. Physiol. 224, 328-337

FRIZZELL, R.A., M.J. KOCH and S.G. SCHULTZ (1976): Ion transport by rabbit colon: I. Active and Passive components. J. Membran Biol. 37, 297-316

FRIZZELL, R.A. and S.G. SCHULTZ, (1979) Models of electrolyte absorption and secretion by gastrointestinal epithelia. In: Gastrointestinal Physiology III, 19, (Ed by R.K. Crane) 205-225

FRIZZELL, R.A., D.R. HALM and E.J. KRASHNY (1983): Relationships between chloride and potassium secretion across large intestine. In: Mechanism of intestinal electrolyte transport and regulation by calcium (Ed.: Donowitz, M., Sharp G.W.G.) Alan R. Liss, Inc, New York, 35-46.

GARCIA-AUSTT, J., D.W. GOOD, M.B. BURG and M.A. KNEPPER (1985): Deoxycorticosterone-stimulated bicarbonate secretion in rabbit cortical collecting ducts: effects of luminal chloride removal and in vivo acid loading. Am. J. Physiol. 249, F205-F212

GREGGER, R. (1985): Ion transport mechanism in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. Physiol. Rev. 65, 760-797

GUNTHER, R.D. and E.M. WRIGHT (1983): Na^+ , Li^+ and Cl^- transport by brush border membranes of rabbit jejunum. J. Membr. Biol. 74, 85-94

HARLAN, E.I. and D.G. WARNOCK (1983): Na^+/H^+ antiporter of the renal proximal tubule.

In: Ion transport processes in apical membranes of epithelia (Ed.: D.G. Warnock) Symposium Summary, Fed. Proc. 43, 2481-2483

KINSELLA, J.L. and P.S. ARONSON (1980): Properties of the Na^+-H^+ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. Am. J. Physiol. 238, F461-F469

KNICKELBEIN, R., P.S. ARONSON, W. ATHERTON and J.W. DOBBINS (1983): Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. I. Evidence for Na-H exchange. Am. J. Physiol. 246, G504-G510

KNICKELBEIN, R., P.S. ARONSON, C.M. SCHRON, J. SEIFTER and J.W. DOBBIN (1985): Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. II. Evidence for $\text{Cl}-\text{HCO}_3$ exchange and mechanism of coupling. Am. J. Physiol. 249, G236-G245

LOTE, C.J. (1982): Principles of renal physiology
Coom Held, London & Canberra

MADARA, J.L. and M.A. MARCIAL (1985): Structural correlates of intestinal tight-junction permeability.
In: Mechanism of intestinal electrolyte transport and regulation by calcium (Ed.: Donowitz, M., Sharp, G.W.G.) Alan R. Liss, Inc., New York, 77-100

MCKINNEY, T.D. and M.B. BURG (1977): Bicarbonate transport by rabbit cortical collecting tubules. Effect of acid and alkali loads in vivo on transport in vitro. J. Clin. Invest. 60, 766-768

- MIRCHEFF, A.K., H.E. IVES, V.J. YEE, and D.G. WARNOCK: Na^+/H^+ antiporter in membrane population resolved from a renal brush border vesicle preparation.
Am. J. Physiol. 246, F853-F858
- MURER, H. and G. BURCKHARDT (1983): Membrane transport of anions across epithelia of mammalian small intestine and kidney proximal tubule.
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 96, 1-50
- MURER, H., U. HOPFER and R. KINNE (1976): Sodium/proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney.
Biochem. J. 154, 597-604
- NORD, E.P., A. HAEFZI, E.M. WRIGHT and L.G. FINE (1984): Mechanism of Na^+ uptake into renal brush border membrane vesicles.
Am. J. Physiol. 247, F548-F554
- PODESTA, R.B. and D.F. METTRICK (1977): HCO_3^- transport in rat jejunum: relationship to NaCl and H_2O transport in vivo.
Am. J. Physiol. 232, E62-E68
- SACHS, Z. (1984): Angewandte Statistik, 6. Auflage, Springer Verlag, New York-Heidelberg-Berlin, 230-235
- POWELL, D.W. and C.C. FAN (1985): Coupled NaCl transport: co-transport or parallel ion exchange.
In: Mechanism of intestinal electrolyte transport and regulation by calcium (Ed.: Donowitz, M., Sharp, G.W.G.) Alan R. Liss, Inc., New York 1985, 13-26

SANDLE, G.I., J.P. HAYSLETT and H.J. BINDER (1984): Effect of chronic hyperaldosteronism on the electrophysiology of rat distal colon.

Pflügers Arch. 401, 22-26

SCHARRER, E. and M. HOSSER (1980): Effect of feeding a high protein diet on solute-coupled water absorption from rat colon.

Pflügers Arch. 338, 165-168

SCHULTZ, S.G. (1981): Salt and water absorption by mammalian small intestine.

In: Physiology of the Gastrointestinal Trakt, Vol. 2 (ed. Johnson R.H.) 983-989, Raven Press, New York

SEIFTER, J.L., R. KNICKELBEIN and P.S. ARONSON (1984): Absence of Cl-OH exchange and NaCl cotransport in rabbit renal microvillus membrane vesicles.

Am. J. Physiol. 247, F753-F759

SIMOPOULOS, A.P. and F.C. BARTTER (1980): The metabolic consequences of chloride deficiency.

Nutr. Rev. 38, 201-205

SMITH, P.L. and R.D. MCCABE (1984): Mechanism and regulation of cellular potassium transport by the colon.

Am. J. Physiol. 247, G445-G456

STOEBEL, D.P. and A.M. GOLDNER (1975): Ion transport across the rat colon.

Physiologist 18, 410

TAI, Y.H. and R.A. DECKER (1980): Mechanism of electrolyte transport in rat ileum.

Am. J. Physiol. 238, G208-G212

TURNBERG, L.A. (1980): Intestinal transport of salt and water.

Clin. Sci. Molec. Med. 54, 337-348

VERNAY, M., J. MARTY and J.-P. MOATTI (1984): Absorption of electrolytes and volatile fatty acids in the hindgut of the rabbit. Circadian rhythm of hindgut electrolytes and plasma aldosterone.

Brit. J. Nutr. 52, 419-428

WELSH, L.J., P.L. SMITH, M. FROMM and R.A. FRIZZELL (1982): Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion.

Science 218, 1219-1221

YAU, W.M. and G.M. MAKLOUF (1975): Comparison of transport mechanism in isolated ascending and descending rat colon.

Am. J. Physiol. 238, 191-195

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Professor Dr. E. Scharrer für die Ueberlassung des Themas und für die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. M. Wanner für die Uebernahme des Korreferates

Herrn Dr. S. Wolffram für die stets bereitwillige Mithilfe bei der Planung und Abfassung der Arbeit.

Herrn Dr. H. Lutz für die Mithilfe bei der Blutgasanalyse.

Frau S. Pletscher für die Anfertigung der graphischen Darstellungen.

Lebenslauf

- 1960 geboren am 26. August in Zürich als Tochter von
Hans Würmli und Gaby Würmli geborene Hauser
- 1967-1973 Primarschule in Adliswil
- 1973-1975 Sekundarschule in Adliswil
- 1975-1979 Mittelschule an der Kantonsschule Stadelhofen (ZH)
Matura Typus C
- 1979-1984 Studium der Veterinärmedizin an der Universität
Zürich
- 1984 im Herbst, Staatsexamen an der Universität Zürich
- 1984 seit Dezember, Doktorandin am Institut für
Veterinär-Physiologie der Universität Zürich

